



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO**

**“EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LA  
SPINACIA OLERACEA EN LA EXPRESIÓN DE TFG- $\beta$   
EN EL TEJIDO RENAL DE RATAS HIPERGLUCÉMICAS,  
ASOCIADO A LA FORMACIÓN DE N-CARBOXIMETIL-L-  
LISINA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL:  
GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA  
INTERNA**

**PRESENTA:**

**LUIS JOSÉ PINTO GARCÍA**

**TUTOR-DIRECTOR DE TESIS Y/O ASESORES**

**DR. EN C. JOSE JAVIER FLORES ESTRADA  
DRA. LIZBETH TERESA BECERRIL MENDOZA**



**CIUDAD DE MEXICO, SEPTIEMBRE 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AUTORIZACIÓN DE LA TESIS

EFFECTO DEL EXTRACTO METANOLICO DE LA SPINACIA OLERACEA EN LA EXPRESION DE TGF- $\beta$  EN EL TEJIDO RENAL DE R/  $\beta$  GLUCEMICAS, ASOCIADO A LA FORMACION DE N-CARBOXIMETIL-L-LISINA"

HJM 010/23-I



LUIS JOSE PINTO GARCIA  
TESISTA



DRA. LIZBETH TERESA BECERRIL MENDOZA  
DIRECTORA DE TESIS



DR. EN C. JOSE JAVIER FLORES ESTRADA  
DIRECTOR DE TESIS / ASESOR METODOLOGICO



DRA. ERIKA GOMEZ ZAMORA  
SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA



DR. ERIK E. SOSA DURAN  
JEFE DE POSGRADO

# INDICE

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. RESUMEN</b> .....                                                       | <b>1</b>  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....                                                  | <b>2</b>  |
| <b>3. ANTECEDENTES</b> .....                                                  | <b>5</b>  |
| 3.1 LA ESPINACA .....                                                         | 5         |
| 3.2 DIABETES MELLITUS .....                                                   | 7         |
| 3.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y DIABETES MELLITUS.....                                 | 10        |
| 3.6 LA VIA DE LOS PRODUCTOS AVANZADOS DE LA GLICOSILACION Y SU RECEPTOR ..... | 11        |
| <b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....                                    | <b>15</b> |
| <b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....                                                 | <b>16</b> |
| <b>6. PREGUNTA DE INVESTIGACION</b> .....                                     | <b>17</b> |
| <b>7. HIPOTESIS</b> .....                                                     | <b>17</b> |
| <b>8. OBJETIVOS</b> .....                                                     | <b>18</b> |
| 7.1 OBJETIVO GENERAL.....                                                     | 18        |
| 7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....                                               | 18        |
| <b>8. METODOLOGIA</b> .....                                                   | <b>18</b> |
| 8.1 DISEÑO DEL ESTUDIO .....                                                  | 18        |
| 8.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                 | 18        |
| 8.3 ELABORACIÓN DE EXTRACTOS.....                                             | 19        |
| 8.4 ANIMALES Y SUS CONSIDERACIONES ÉTICAS.....                                | 19        |
| 8.5 MODELO DE INDUCCIÓN DE HIPERGLUCEMIA EN RATAS Y GRUPOS DE ESTUDIO .....   | 20        |
| 8.6 COLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS. ....                                | 21        |
| 8.7 INMUNOTINCIÓN .....                                                       | 21        |
| <b>9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....                                          | <b>22</b> |
| <b>10. RESULTADOS</b> .....                                                   | <b>22</b> |
| 10.1 DEPÓSITOS DE CARBOXIMETIL-L-LISINA (CML) EN EL TEJIDO RENAL .....        | 22        |
| 10.2 EFECTO DE EME SOBRE LA EXPRESIÓN RAGE .....                              | 23        |
| 10.3 EFECTO DE EME SOBRE LA EXPRESIÓN DE TGF- $\beta$ RENAL.....              | 24        |
| <b>11. DISCUSIÓN</b> .....                                                    | <b>25</b> |
| <b>12. CONCLUSIONES</b> .....                                                 | <b>27</b> |
| <b>13. FINANCIAMIENTO</b> .....                                               | <b>27</b> |
| <b>14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....                                   | <b>28</b> |

## 1. RESUMEN

**Introducción:** La nefropatía diabética (ND) es un trastorno progresivo que inicia con microalbuminuria y es la principal causa de falla renal e inicio de terapia de sustitución renal. En la ND, la hiperglucemia cumple un papel importante en la formación de carboximetil-lisina (CML) como un producto final de la glicación avanzada. La interacción de CML con el receptor RAGE (CML/RAGE) participa en la fibrogénesis renal. Se ha demostrado que los fitoquímicos de la *S. oleracea* poseen propiedades anti-AGEs. Sin embargo, se desconoce sus efectos en la fibrosis renal en la ND. **Objetivos:** Determinar el efecto del extracto metanólico de espinaca (EME) en la fibrogénesis asociados a la formación de CML, RAGE y TGF- $\beta$ , en el tejido renal de ratas con hiperglucemia crónica. **Materiales y métodos:** Se utilizaron ratas macho Wistar y se dividieron al azar en cuatro grupos (n=8): (1) ratas hiperglucémicas inducidas con estreptozotocina y tratadas con vehículo (STZ); (2) ratas STZ tratadas con 400 mg/kg del EME (STZ-EME) y (3) Ratas normoglucémicas tratadas con vehículo (NG). A las 12 semanas se sacrificaron y se colectaron los tejidos renales. En los cortes histológicos se evaluó la inmunolocalización y la intensidad de tinción de CML, RAGE y TGF- $\beta$ 1. Las intensidades de tinción se evaluaron por el programa Image ProPlus (versión) y el análisis estadístico por ANOVA test de una vía.  $p < 0.05$  es considerado estadísticamente significativo. **Resultados:** Encontramos que la distribución de la CML en los DM fue positivo citoplasmático en células mesangiales y capsula de Bowman, e intenso y focal en epitelio tubular. Mientras que en el grupo tratado se encontró citoplasmático débil únicamente en epitelio tubular ( $p < 0.05$ ). En cuanto a expresión de RAGE se encontraba positivo citoplasmático intenso en el grupo DM en endotelio y podocitos y en el grupo tratado con el extracto negativo ( $p < 0.01$ ). TGF- $\beta$  se encontró positivo citoplasmático intenso y focal asociado a zonas de lesión tubular aguda; y difuso y débil en epitelio tubular residual. La intensidad de TGF- $\beta$  en EME es menor ( $p < 0.05$ ). **Conclusión:** Los fitoquímicos contenidos en el EME poseen una acción benéfica en la atenuación del daño renal causado por el incremento del estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia; a una dosis de 400mg/kg/día administrado por doce semanas de forma intragástrica disminuye la formación de carboximetil-L-Lisina, y la expresión de RAGE y TGF- $\beta$ 1.

## 2. INTRODUCCIÓN

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones más frecuentes en la Diabetes Mellitus (DM). Esta se caracteriza por proteinuria, hipertensión y reducciones progresivas de la función renal con alta morbilidad y mortalidad (1). Se estima que casi la mitad de todos los pacientes con DM tipo 2 (DMT2) y un tercio con DM tipo 1 desarrollarán enfermedad renal crónica a lo largo de su vida. Aproximadamente, el 5 % de los pacientes recién diagnosticados con DMT2 muestran evidencia de afectación de la función renal y tienen riesgo de desarrollar nefropatía 10 años posterior a su diagnóstico (2). En contraste con otras complicaciones asociadas a la diabetes mellitus, la nefropatía diabética no ha experimentado una disminución en su prevalencia en las últimas tres décadas. La ND es en la actualidad, la principal causa de insuficiencia renal y el inicio de tratamientos de sustitución renal a nivel mundial (3).

Un estudio realizado en 2017 en el Estado de México, que incluyó a 44,458 sujetos diagnosticados con DMT2, registró la presencia de ND en 9.1% en la población estudiada (4). En un estudio transversal analítico realizado en 488 pacientes diabéticos la prevalencia de enfermedad renal crónica fue de 32% (5). En 2019, México registró un incremento de pacientes con enfermedad renal crónica, ocupando el décimo lugar de mortalidad por la enfermedad a nivel mundial (6).

A pesar de que mantener un estricto control de los niveles de glucosa en la sangre reduce la presencia de albuminuria en la orina y retrasa la progresión de la enfermedad, no se observan diferencias en los desenlaces clínicos (7-10). En consecuencia, se necesitan estrategias terapéuticas adicionales para evitar la progresión de la nefropatía diabética. Estas estrategias deben centrarse en lograr la normalización de los niveles de glucosa con un menor riesgo de hipoglucemia, así como en contrarrestar los efectos perjudiciales derivados de la activación de diversas vías de señalización molecular.

Debido a que la hiperglicemia genera la formación y acumulación de AGEs que predispone la ND, se han desarrollado varias estrategias para inhibirla. La

aminoguanidina (pimagedina) es un inhibidor de la diamino-oxidasa y de la sintasa de óxido nítrico (NOS) que actúan reduciendo los niveles de AGEs a través de la interacción con 2-desoxi-D-glucosa y proteinuria, este inhibidor además reduce los niveles de citocinas profibróticas, depósitos de colágeno tipo IV, carbonilación de proteínas, y albuminuria de manera significativa, incluyendo la activación de la proteína quinasa (11-17). La piridoxamina, un derivado de la vitamina B6, también evita la acumulación de AGEs, previniendo la disfunción renal al disminuir los niveles séricos de creatinina, TGF- $\beta$ 1, CML (18,19). De manera similar, otros compuestos han mostrado en la clínica y en modelos experimentales la disminución de la acumulación de AGEs a nivel renal, menor rigidez de las arterias con mejoramiento de la función ventricular, inhibición de citoquinas profibróticas, estrés oxidativo, transdiferenciación celular, proteinuria, e inhibición de la activación de PKC (20).

Con el objetivo de proteger contra el daño renal causado por niveles elevados de glucosa en sangre, se han realizado estudios en modelos animales para probar varios fitoquímicos purificados o presentes en extractos naturales. Estos estudios han demostrado que estos compuestos tienen capacidad citoprotectora al reducir factores profibróticos, oxidativos e inflamatorios. Se ha observado que los compuestos aislados del extracto metanólico de Epidemii herba muestran actividad anti-AGEs in vitro al inhibir la formación de CML y N ( $\omega$ )-(carboximetil) arginina (CMA) durante la incubación de ribosa con gelatina derivada del colágeno (21). Shen y colaboradores han identificado una serie de compuestos de origen vegetal con la capacidad de inhibir tanto la reacción de Maillard como la vía AGE-RAGE. Estos fitoquímicos podrían tener el potencial de actuar como agentes quimiopreventivos y protectores del daño renal al regular diversas vías que contribuyen al desarrollo de la nefropatía diabética.

La espinaca contiene una cantidad significativa de compuestos fenólicos con propiedades funcionales notables. Estos compuestos presentan actividad antioxidante al actuar como eliminadores de especies reactivas de oxígeno, lo que reduce el daño oxidativo en macromoléculas. Además, exhiben capacidad para

inhibir la activación de la vía de señalización inflamatoria y sus marcadores proinflamatorios asociados. Estudios epidemiológicos y en modelos animales han revelado los efectos protectores y preventivos de la espinaca al disminuir factores de riesgo relacionados con el síndrome metabólico, como la obesidad, la hiperglucemia y la hipertrigliceridemia (22,23,24) Es importante destacar que los extractos acuosos, los glucolípidos y los tilacoides derivados de la espinaca no han mostrado efectos adversos según investigaciones previas (25,26). Aunque se desconoce el efecto benéfico de los fitoquímicos contenidos en la espinaca en la protección del daño renal, asociado a la regulación del eje AGE-RAGE; se ha identificado que algunos de sus fitoquímicos poseen efectos en la vía AGE-RAGE. Por ejemplo, estudios usando B-caroteno, han demostrado efectos significativos en la inhibición de la formación de AGEs *in vitro* evitando cambios estructurales secundarios en albumina sérica bovina (BSA) debido a la glicación térmica (27). En retinas de ratas con hiperglucemia, la administración de la quercetina y de carotenoides (luteolina y la astaxantina) presenta efectos neuroprotectores al reducir mediadores del estrés oxidativo (glutación, superóxido dismutasa y catalasa) e inflamatorios (NF-kB, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1, MCP-1) con reducción del daño neuronal observado por la baja expresión de GFAP y caspasa-3 (28-32). Las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) dañadas por fotooxidación, son protegidas por la quercetina al inhibir la formación de MGO y la expresión de RAGE, así como la atenuación de factores proinflamatorios y apoptóticos (33). Al parecer la acción inhibitoria de la quercetina sobre los AGEs se debe a que su estructura química posee sitios para quelar o atrapar el MGO y convertirlo en aductos (mono-MGO y di-MGO) evitando la reacción de Maillard (34).

El objetivo del presente estudio es investigar el papel del extracto metanólico de espinaca (EME) en la fibrosis renal asociada a la formación del AGE CML con RAGE (CML-RAGE) en un modelo animal con hiperglucemia crónica.



### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 LA ESPINACA**

La espinaca, *Spinacea oleracea var. L*, es una hortaliza de hoja verde ampliamente consumida debido a sus numerosas propiedades benéficas. Es baja en grasas y calorías, al mismo tiempo que es rica en fibra y micronutrientes como vitamina C, vitamina A y minerales, especialmente hierro. Se trata de una planta de hojas comestibles que se cosecha anualmente y se consume de diversas formas. Los primeros registros de esta planta se remontan al siglo VII en China. Posteriormente, fue introducida desde Persia a España alrededor del siglo XI y, a partir de allí, se extendió al continente americano durante el período de colonización. (35).

##### **3.1.1 Valor nutricional**

Cada 100 gramos de espinaca contienen aproximadamente 23 calorías, con un 2% de carbohidratos, un 3% de proteínas y un 91% de agua. Esta hortaliza se caracteriza por tener un contenido proteico relativamente alto en comparación con otros vegetales, además de proporcionar una cantidad significativa de fibra, tanto soluble como insoluble. La espinaca también es rica en vitaminas A, C, E, K, B2, B6 y B9, y ofrece una variedad de minerales como hierro, calcio, magnesio, fósforo, potasio, manganeso, cobre y zinc. Estos nutrientes le confieren un valor nutricional destacado, especialmente cuando se consume fresca. (36).

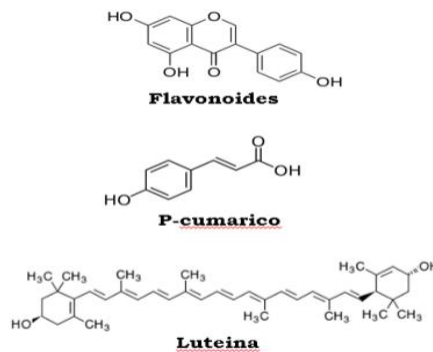
##### **3.1.2 Composición química y propiedades biológicas**

La espinaca tiene un alto valor nutricional. Se compone principalmente de agua (91,4%) además de pequeñas cantidades de proteínas (2,9%), carbohidratos (3,6%) y grasas (0,4%). Su fracción lipídica está compuesta de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (como el ácido linolénico alfa72, ácido linoleico, ácido oleico) y ácidos grasos saturados (como ácido capríco, ácido mirístico, ácido esteárico) (35,37).

En una ración de espinaca (100g) hay 2,2 g de fibra que equivale al 8,8% de la cantidad diaria recomendada para una dieta de 2000 kcal. Además, contiene altos

niveles de magnesio, potasio y hierro que cumplen con el 20%, 16% y 15%, respectivamente, de su cantidad diaria. La misma ración contiene suficientes vitaminas para alcanzar o superar parcialmente su dosis diaria recomendada, incluida la vitamina K (604%), vitamina A (188%), ácido fólico (49%) y vitamina C (47%) (38). Esta hortaliza es considerada como una de las fuentes más ricas de carotenos (pigmentos naturales que participan en la captación de luz en la fotosíntesis y son barredores de especies reactivas de oxígeno). La luteína es uno de los carotenoides principales de la planta que ha reportado tener propiedades preventivas en la degeneración macular y formación de cataratas (37). Estos son producidos como metabolitos secundarios en respuesta a diversas condiciones ambientales. Especialmente hay un alto contenido de flavonoides derivados de la patuletina, spinacetina, spinatosida, jaceidina, flavona, ácido ferúlico y ácido p-coumárico, trazas de quercetina y kaempferol. No obstante, a pesar de ser una excelente fuente de compuestos fenólicos, la espinaca solo aporta el 0.8 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/día por persona debido a su baja ingesta diaria (1.6 g/día) según los datos registrados por la Autoridad Americana de Seguridad Alimentaria (21<sup>i</sup>).

La espinaca alberga componentes fenólicos producidos en respuesta al estrés ambiental, por ejemplo: bajas temperaturas, radiación ultravioleta, deficiencia de nutrientes y patógenos. Los fenoles poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas y antivirales. Estos se clasifican en 4 grupos según su estructura química: Ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y flavonoides. Entre los flavonoides se encuentran la quercetina, kaempferol, patuletina, spinacetina, spinatosida, jaceidina y flavona (FIGURA 1). La espinaca, junto con el brócoli, tiene el mayor contenido de ácido fenólico total entre las verduras de hoja verde, los principales ácidos fenólicos encontrados son; el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico. En cuanto a los lignanos, estos son metabolizados por la microflora intestinal en fitoestrógenos biológicamente activos, enterolactona y enterodiol. Los principales lignanos que se encuentran en las espinacas son lariciresinol, secoisolariciresinol y pinioresinol (36).



**Figura 1.** Adaptada de Roberts JL, Moreau R. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food Funct.* 2016;7(8):3337–53.

## 3.2 DIABETES MELLITUS

### 3.2.1 Definición

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico en el que se manifiesta un aumento de los niveles de glucosa en la sangre debido a la falta parcial o total de insulina. Se trata de una enfermedad crónica que abarca diversos trastornos que afectan la producción y utilización de la insulina en el organismo. La diabetes mellitus tipo 1 se distingue por la destrucción de las células beta en el páncreas debido a una respuesta autoinmune, lo cual resulta en una falta completa de producción de insulina. Por lo general, afecta a niños y adolescentes. Por otro lado, la DM tipo 2 se caracteriza por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y contabiliza aproximadamente el 90% de todos los casos de DM (39,40).

### 3.2.2 Epidemiología

La diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial. De acuerdo con las estimaciones de la Federación Internacional de Diabetes, en el año 2013 habían alrededor de 382 millones de personas entre los 20 y 70 años que padecían diabetes en todo el mundo. Se proyecta que para el año 2035 esta cifra aumentará a aproximadamente 592

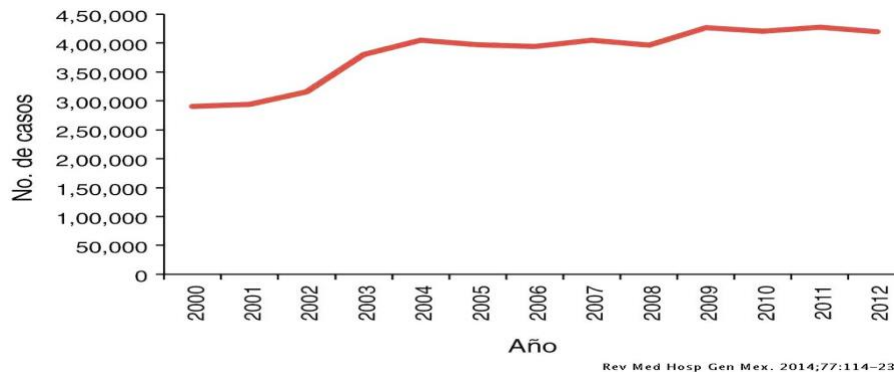
millones. (41). Los factores de riesgo como la obesidad, el sedentarismo, estilos de vida y alimentación inadecuados se encuentran en aumento en gran parte de la población mundial (40).

En México, la diabetes mellitus tipo 2 ha alcanzado proporciones epidémicas y su prevalencia ha experimentado un rápido aumento. Dentro de las enfermedades crónico-degenerativas, la diabetes ha mostrado el incremento más significativo en los últimos años. Según un estudio realizado en 2010, se reportó una prevalencia del 14.42% de casos de diabetes, y por cada caso previamente diagnosticado se identificó otro caso nuevo. La edad promedio de fallecimiento de las personas con diabetes en 2010 fue alrededor de los 65 años, y la esperanza de vida de las personas con diabetes se reduce entre 5 y 10 años. (42).

Por otro lado, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, se indica que la prevalencia de diabetes por diagnóstico previo es del 9.17% (equivalente a 6.4 millones de personas), y se estima que para el año 2025 esta cifra aumente al 12.3%. En las áreas urbanas, se observó una prevalencia del 9.7%, mientras que en las áreas rurales fue del 7%. Las mujeres presentaron una prevalencia del 9.67% (equivalente a 3.5 millones de personas), mientras que los hombres mostraron una prevalencia del 8.6% (equivalente a 2.8 millones de personas). La edad más frecuente de diagnóstico de diabetes fue entre los 50 y 69 años, representando el 63.9% de los casos.

Según datos proporcionados por la Federación Internacional de Diabetes, en el año 2013 se registraron en México aproximadamente 8.7 millones de casos de diabetes con una prevalencia del 11.77% en personas de 20 a 79 años. Desde el año 2003, se han reportado alrededor de 400,000 nuevos casos de diabetes anualmente. Es importante destacar que el diagnóstico de la enfermedad generalmente se realiza después de 7 a 10 años de su inicio. Durante el periodo de 2002 a 2011, la incidencia de diabetes (sin ajuste por edad) aumentó gradualmente, pasando de

una tasa de 308.6 a 391.07 por cada 100,000 habitantes. Esto indica que la incidencia de diabetes ha seguido aumentando de forma constante. (42).



**Figura 2.** Adaptado de Rev Med Hosp Gen Mex 2014; 77:114

### 3.2.3 Aspectos fisiopatológicos

La nefropatía diabética está caracterizada histopatológicamente por la acumulación de matriz extracelular (MEC), y su progresión consta de tres pasos: (i) hipertrofia glomerular e hiperfiltración; (ii) inflamación de glomérulos y regiones tubulointersticiales; y (iii) reducción del número de células por apoptosis y acumulación de MEC. La hiperglucemia es el factor predominante que subyace en el desarrollo de ND que a su vez activa 3 importantes vías; La primera vía es la anomalía del metabolismo intracelular, como la activación de las vías de los polioles y PKC (proteína quinasa C). La segunda vía es la formación de AGE (productos tóxicos finales de la glucosilación avanzada) que son un grupo de proteínas modificadas y/o lípidos que se vuelven glicadas tras su exposición a azúcares, que inducen una alteración de la barrera de filtración glomerular al aumentar la permeabilidad de las células endoteliales, alterando la glicocálix endotelial y finalmente resultando en albuminuria. La vía RAGE (receptor para AGE) está críticamente involucrada en la transducción de la señalización celular subsiguiente relacionada con la inflamación y el estrés oxidativo. La activación de esta vía por los AGE lleva a la generación de especies reactivas de oxígeno (en inglés: ROS)

además de disminuir los niveles de enzimas antioxidantes y los niveles celulares de glutatión, su activación resulta en la sobre regulación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH), óxido nítrico sintasa (en inglés: NOS) y ciclooxigenasa (COX), con ello amplificando la inflamación y contribuyendo al establecimiento de un estado crónico inflamatorio en los riñones, culminando en la pérdida gradual de la arquitectura renal y su función. (4, 43)

### **3.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y DIABETES MELLITUS**

El estrés oxidativo se produce cuando la generación de radicales libres excede la capacidad antioxidante natural del cuerpo para neutralizar estos compuestos químicos altamente reactivos. Esto resulta en un daño celular que se manifiesta en forma de entrecruzamiento del ADN y apoptosis, características distintivas del estrés oxidativo y procesos patológicos clave en el cáncer, el envejecimiento y diversas enfermedades crónicas. En el caso de la diabetes mellitus, se ha conocido desde hace tiempo que la alteración de la homeostasis redox desempeña un papel en la patogénesis de la enfermedad y sus complicaciones, a través de diferentes mecanismos. Se ha demostrado que los pacientes diabéticos presentan niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y daño inducido por ROS en el ADN a nivel celular (44).

El aumento de la carga glucémica en la diabetes afecta negativamente al ciclo de Krebs, lo que resulta en la interrupción de la transferencia de electrones en la membrana mitocondrial y la acumulación de radicales libres. Estos radicales libres, como el superóxido y el hidroxilo, son altamente reactivos. A medida que se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), se activan de forma positiva cuatro vías bioquímicas. Estas alteraciones generan una variedad de efectos secundarios en la patogénesis y progresión de la diabetes mellitus. Estos efectos incluyen la disminución de las moléculas antioxidantes naturales, el daño a las células vasculares, así como cambios en la expresión de genes y proteínas, el flujo sanguíneo y la permeabilidad de las células endoteliales (45).

### **3.6 LA VIA DE LOS PRODUCTOS AVANZADOS DE LA GLICOSILACION Y SU RECEPTOR**

El mecanismo fisiopatológico que conlleva al desarrollo y avance de la nefropatía diabética (ND) se origina a partir de la formación y acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), siendo la hiperglucemia el factor más relevante en su formación (46-49). Los AGEs se generan a través de la glicación no enzimática, que implica la reacción entre grupos carbonilos de azúcares reductores y grupos aminos de proteínas (especialmente lisina y arginina) que son susceptibles a modificaciones. Estos compuestos resultantes suelen ser persistentes y pueden tomar meses o incluso años para degradarse. En la etapa inicial de esta reacción, se forman bases de Schiff, que son reversibles e inestables. Estas bases de Schiff experimentan un reordenamiento estructural y se convierten en productos de Amadori, como la hemoglobina glicada. A través de una serie de procesos, como deshidratación, oxidación, transposición y fragmentación, los productos de Amadori se estabilizan y se transforman en los productos finales de glicación avanzada (AGEs) (50). Se han identificado diversos tipos de productos finales de glicación avanzada (AGEs) en tejidos humanos, sangre y alimentos; tanto fluorescentes como no fluorescentes. Entre ellos la N $\epsilon$ -(carboximetil) lisina (CML), la hidroimidazolona, la pentosidina, el furoil-furanil imidazol, el 1-alkyl-2-furil-3,4-glicosil-pirrol, la argpirimidina, los dímeros de glioxal-lisina y los dímeros de metilglioxilamina (51-54). Su velocidad de formación no solo está determinada por la vida útil de las proteínas, sino también por factores como la composición del azúcar reductor, la presencia de iones metálicos, el equilibrio redox y la actividad de las glioxilasas citoplasmáticas. Su eliminación incluye la proteólisis extracelular y su captación mediada por receptores, seguida de degradación intracelular (55-57).

#### **3.6.1 Vía de los productos avanzados de la glicosilación y fibrogénesis renal**

Estudios en modelos animales, han sugerido que los (AGEs) son filtrados a través del glomérulo y ulteriormente reabsorbidos por las células de los túbulos proximales. (58-60). Los macrófagos y las células de Kupffer desempeñan un papel activo en la endocitosis de los productos finales de glicación avanzada (AGEs), lo que resulta

en la generación de péptidos solubles de bajo peso molecular. Estos péptidos son posteriormente excretados en la orina a través de la función renal (61). No obstante, cuando se produce una pérdida de la homeostasis, los AGEs pueden acumularse en diversas células, como las células endoteliales, tubulares, mesangiales y los podocitos. Esto desencadena la activación de mecanismos que incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la expresión de factores de crecimiento y la liberación de mediadores proinflamatorios, entre otros. Estos procesos resultan en el engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG), la acumulación de matriz extracelular (ECM), la expansión mesangial, la apoptosis de los podocitos, la esclerosis glomerular y la reducción de la filtración glomerular, lo cual finalmente conduce a la fibrosis intersticial y la glomeruloesclerosis. (22, 62)

Durante la progresión de la nefropatía diabética, se ha observado que los niveles elevados de AGEs derivados del metilglioxal (MGO), como la hidroimidazolona derivada de metilglioxal (MG-H1), la carboximetil lisina (CML) y la carboxietil lisina (CEL), se correlacionan con el engrosamiento de la membrana basal glomerular. (63,64). Se ha observado que la glucoxidación o el producto de lipoxidación conocido como CML (carboximetil lisina) aumenta la acumulación de lípidos en las células epiteliales tubulares renales humanas. (65). Lo que sugiere que la reducción en la producción de AGEs favorecería la protección renal (63-65).

Además, se han identificado diversos receptores para los productos finales de glicación avanzada (AGEs), como AGER1, AGER2, AGER3, receptores scavenger ScR-II, CD-36 y RAGE. (66). RAGE es el receptor más ampliamente estudiado y caracterizado dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se ha investigado y comprendido en detalle tanto su estructura como su función (67-68). Este mismo, se expresa en varios tipos de tejidos y células inmunológicas diferenciadas, incluyendo los riñones en donde se encuentra en concentraciones bajas en los podocitos y se expresa de manera significativa en las células del epitelio tubular (69-73). El daño renal causado de manera indirecta por los AGEs se explica a través de su interacción con el receptor RAGE (AGEs-RAGE). Esta interacción promueve la formación de más AGEs en condiciones de hiperglucemia, lo que a su vez



desencadena ciclos de retroalimentación positiva entre los AGEs y las vías de señalización mediadas por RAGE. Estos ciclos generan un círculo vicioso de daño tisular, contribuyendo así al deterioro renal (74).

La interacción entre los AGEs y su receptor RAGE desempeña un papel importante en la fibrogénesis de la nefropatía diabética. La activación de vías como la proteína quinasa C y el factor nuclear kappa B (NFκB), inducida por estrés oxidativo, resulta en el aumento de factores pro-fibróticos como el factor de crecimiento transformante (TGF-β1), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (75-77). La inhibición de la enzima NADPH oxidasa o la proteína quinasa Cα (PKCα) en ratas diabéticas reduce la acumulación de factores como VEGF-A, superóxido, colágeno IV y fibronectina, así como también disminuye la albuminuria y la glomeruloesclerosis (78).

En la fibrosis renal, la interacción entre los productos finales de glicación avanzada (AGEs) y el receptor RAGE desencadenan hipertrofia de la matriz, lo que se asocia con un aumento en la expresión de TGF-β1 y activación subsiguiente del sistema canónico Smad-2/3 (79-83). La activación de la vía canónica del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) provoca la acumulación de matriz extracelular y el engrosamiento de la membrana de la barrera glomerular. Además, se observa una transdiferenciación de las células epiteliales y endoteliales hacia células mesenquimales, lo que implica que las células endoteliales comienzan a expresar características propias de las células mesenquimales, como la α-actina de músculo liso (αSMA), y a perder marcadores endoteliales como VE-cadherina y CD31 (84-88). Inhibidores de la formación de AGE (pilidoxamina, ALT-711, u otro inhibidor de AGE OPB-9195) muestran reducir los niveles de ARNm de TGF-β1 asociados a la disminución en la tasa de excreción de albúmina urinaria en ratones, mejorando la lesión renal en animales hiperglucémicos (89-91).

Dado que la proteína CTGF, activada a través de la vía de TGF-β1-Smad-2/3, desempeña un papel crucial en el daño glomerular y en la transdiferenciación del epitelio al mesénquima inducida por los productos finales de glicación avanzada (AGEs), y considerando que los inhibidores de AGEs como la aminoguanidina y

ALT-711 disminuyen los niveles de CTGF, es posible que se puedan investigar nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en CTGF para prevenir la glomerulosclerosis tubulointersticial en la nefropatía diabética (92-94).

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el año 2016 por medio de la encuesta nacional de salud y nutrición, se estableció que la prevalencia de diabetes mellitus ha incrementado en casi un 10% con respecto al año 2012 y las proyecciones a futuro según la organización mundial de la salud consideran que para el año 2025 8.5% de las personas a nivel mundial presentaran esta entidad y consecuentemente la incidencia y prevalencia de la nefropatía diabética.

Los fitoquímicos contenidos en la espinaca han sido estudiados por sus mecanismos antioxidantes, sin embargo, es poco conocido el efecto que puede tener sobre la atenuación del daño renal en modelos de nefropatía diabética y con seguimiento de marcadores profibroticos. Por lo tanto, se necesitan más investigaciones para determinar el efecto de estos fitoquímicos en dicha patología. Por este motivo, el presente estudio se centra en investigar si dentro de las propiedades benéficas de la espinaca que condicione un efecto anti fibrótico en un modelo inducido con nefropatía diabética.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que engloba diferentes trastornos, caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia) y otros factores. Es un problema global en términos de salud y economía. En nuestro país, la atención a la diabetes es insuficiente, tardía y costosa, ya que afecta a aproximadamente 11.5 millones de personas. Además, cerca del 20% de las muertes prevenibles en México están relacionadas con la diabetes y enfermedades metabólicas. El control de la glucemia y la presión arterial es el principal enfoque en el tratamiento de las enfermedades renales diabéticas (ERD). Sin embargo, la mayoría de los pacientes con diabetes progresan hacia etapas terminales de la enfermedad, lo que eventualmente requiere terapias como la hemodiálisis y el trasplante renal. Por lo tanto, a pesar del control glucémico y la inhibición del sistema renina-angiotensina, existe la necesidad de establecer estrategias terapéuticas complementarias.

Debido a que la formación y acumulación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) y su interacción con diversos componentes celulares, incluido su receptor RAGE, desempeñan un papel en la fisiopatología de la nefropatía diabética (ND), se han propuesto estrategias para prevenir y regular los mecanismos moleculares relacionados con la acumulación de AGEs y la activación de AGE-RAGE. La alta formación de AGEs exógenos provenientes de la dieta puede ser potencialmente perjudicial. Sin embargo, es posible prevenir su formación al reducir el consumo de ácidos grasos n-6 presentes en las dietas occidentales ricas en grasas, así como de productos lácteos y refrescos con alto contenido de fructosa o sacarosa. Por otro lado, se sugiere aumentar el consumo de pescado enriquecido con ácidos grasos n-3 y alimentos de origen vegetal como legumbres, verduras, frutas y granos integrales, ya que estos ayudan a disminuir los niveles de AGEs producidos en el cuerpo. Sin embargo, para que estos alimentos tengan un efecto beneficioso en la salud humana, es necesario consumirlos en cantidades significativas y asegurarse de obtener una cantidad adecuada de fitoquímicos con propiedades funcionales. Existen evidencias que indican que los polifenoles como

el ácido gálico, los flavonoides, las antocianinas y el ácido ferúlico pueden atenuar la glicación de proteínas, inhibir la biosíntesis de AGEs y bloquear la activación de AGE-RAGE. En el caso específico de la espinaca, se ha observado que debido a su contenido de fitoquímicos, posee efectos antioxidantes, antiinflamatorios y, más recientemente, se ha demostrado un efecto anti-AGEs. aún se conoce poco acerca del mecanismo regulador en la fibrogénesis renal asociada a la interacción AGE-RAGE. A medida que se avance en el conocimiento sobre este tema, será posible desarrollar estrategias terapéuticas o preventivas más efectivas. En este contexto, el presente estudio se enfoca en investigar si los fitoquímicos presentes en un extracto metanólico de espinaca pueden atenuar el daño renal causado por la fibrosis mediada por la activación de CML-RAGE en un modelo animal con hiperglucemia. Esto permitirá determinar si el extracto tiene capacidad funcional para mantener la morfología del tejido renal y si RAGE, AGEs y otros marcadores de daño tienen efectos paracrinos en las distintas poblaciones celulares que conforman el tejido. Por lo tanto, este estudio se considera original y abrirá nuevas investigaciones para la intervención terapéutica o preventiva utilizando los bioactivos presentes en la espinaca, los cuales poseen propiedades anti fibróticas asociadas a la activación AGE-RAGE, siendo este uno de los mecanismos implicados y potenciales en el desarrollo de complicaciones como la nefropatía diabética.

## **6. PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿Cuáles son los efectos benéficos de los fitoquímicos contenidos en el extracto metanólico de *Spinacia oleracea* (EME) en la fibrosis renal en ratas con ND, asociados a la activación de CML-RAGE?

## **7. HIPOTESIS**

Los componentes bioactivos contenidos en el EME atenúan la expresión de marcadores fibróticos activados por eje CML-RAGE en el tejido renal de ratas a las que se les induce hiperglucemia y que pueden desarrollar daño renal similar a la ND.

## **8. OBJETIVOS**

### **7.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del EME en la expresión de factores fibróticos activados por la vía CML-RAGE en un modelo de rata con ND inducidas por hiperglucemia.

### **7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Inmunolocalizar la formación de N $\epsilon$ - (carboximetil) lisina y RAGE en el tejido renal de los grupos estudiados.
2. Determinar el efecto de EME en la expresión de marcadores pro-fibróticos en el tejido renal.
3. Determinar la inmuno-colocalización de la expresión de RAGE con marcadores pro-fibróticos en el tejido renal.

## **8. METODOLOGIA**

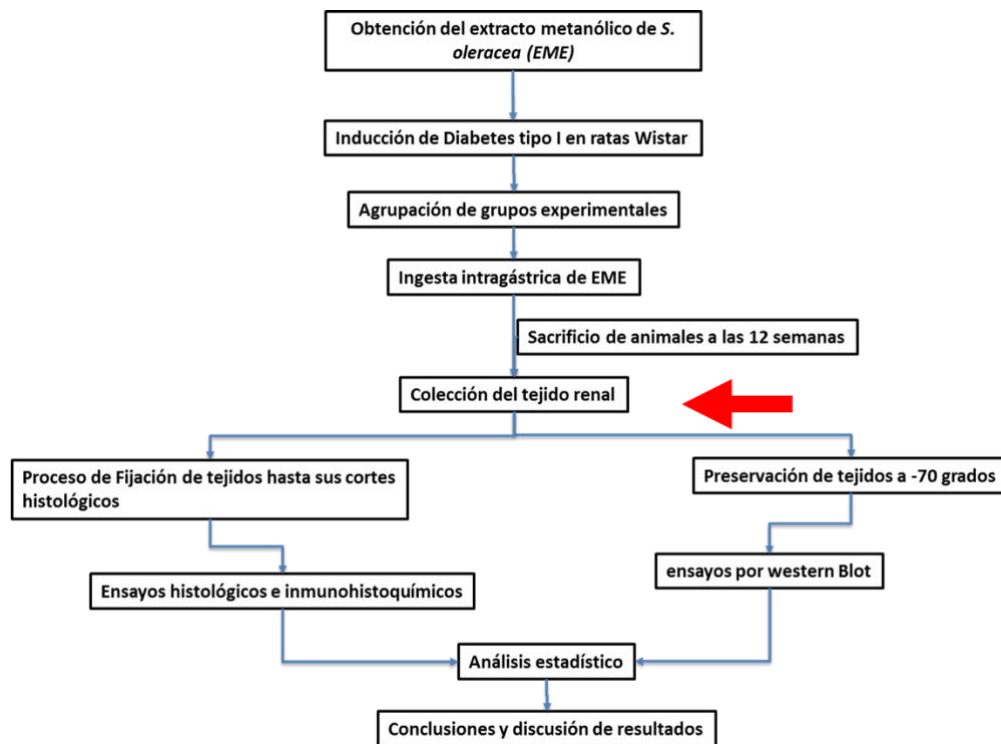
### **8.1 Diseño del estudio**

Experimental y transversal

### **8.2 Materiales y métodos**

En referencia al protocolo aceptado por el Comité de Investigación del Hospital Juárez de México HJM: 010 / 23-I y por el Comité de Ética en Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN ((ENCB/CEI/043/2019), se colectaron diferentes tipos de muestras biológicas, entre ellas, el tejido renal de los diferentes grupos de estudio. Los tejidos fueron almacenados adecuadamente para una posterior pregunta de investigación. No obstante, a continuación, se describen algunos aspectos éticos y procedimientos que fueron previamente considerados y que se seguirán considerando en el presente protocolo.

A manera de ilustración se presenta un diagrama de flujo del diseño experimental, haciendo hincapié en que este proyecto abarca a partir las muestras previamente colectadas y almacenadas (marcado con flecha roja) (Figura 3).



**Figura 3.** Flujograma de diseño experimental

### 8.3 Elaboración de extractos

La espinaca fresca fue cosechada en la época otoño-invierno, adquirida con un proveedor ubicado en el mercado “La Merced” de la CDMX. Las hojas se deshidrataron y trituraron a temperatura ambiente bajo sombra. Para eliminar los compuestos no polares se adicionó, por cada kilogramo de espinaca seca, 5 litros de hexano en reflujo por 3 horas y se llevó a sequedad utilizando un rotavapor al vacío (Yamato water BM 100). Posteriormente la extracción de los componentes polares se realizó con 5 L de metanol en un reflujo por 3 horas, este procedimiento se llevó a cabo dos veces para obtener la mayor concentración de los bioactivos

### 8.4 Animales y sus consideraciones éticas

Las ratas macho de la cepa Wistar con un peso de  $180 \pm 20$  g fueron proporcionadas por el bioterio, previo a la aceptación por el CEI-ENCB. Se mantuvieron en un periodo de adaptación de al menos 7 días; a temperatura constante de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , con humedad relativa del 65-69% y un ciclo alternante luz/oscuridad de 12 horas.

Los animales se alimentaron con dieta estándar (LabDiet 5001®, PMI Nutrition INT'L., LLC) y agua *ad libitum*.

Para el manejo de los animales se utilizó equipo de protección y en caso de heridas causadas por el animal se administró antibiótico de amplio espectro. El cuidado y manejo de los animales estuvo bajo la responsabilidad del investigador principal, investigadores colaboradores del INCar y el encargado del bioterio bajo las especificaciones técnicas descritas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los desechos biológicos, materiales punzo cortantes fueron, y serán, manejados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, así como de acuerdo con la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente.

### **8.5 Modelo de Inducción de hiperglucemia en ratas y grupos de estudio**

Las ratas Wistar con un peso de  $280 \pm 10$  g se mantuvieron en ayuno por 8 horas. Luego, se pre-anestesiaron con sevoflurano para administrar por vía intraperitoneal una dosis de 60 mg/kg de solución fresca de estreptozotocina (STZ; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), preparada en una solución de amortiguador de citratos (ácido cítrico y citrato de sodio 10 mM, pH 4.5). Cinco días después se midió la glucosa (glucómetro; ACCU-CHEK active; Roche diagnostic, GmbH) colectando por punción una gota de muestra sanguínea de la punta de la cola. Los animales con niveles glicémicos superiores a 350 mg/dL fueron incluidos en el estudio y cada 7 días se midió la glucosa en ayuno.

Los animales hiperglucémicos (STZ) se dividieron al azar en dos grupos (n=8): 1) STZ tratados por vía intragástrica con 2 ml de agua potable usado como vehículo (STZ) y STZ tratados con 400 mg/kg del extracto metanólico de espinaca (STZ-EME). Adicionalmente se incluyeron 2 grupos (n=8): Ratas normo-glucémicas tratadas con vehículo (NG) y ratas NG tratadas con EME a 400 mg/kg (NG-EME). Las dosis asignadas se administraron cada 24 horas (10:00 am) por 12 semanas.

El régimen de dosificación del EME (400 mg/kg) se fundamentó en lo siguiente: 1-siete gramos del extracto equivale a un consumo diario 100 gr de espinaca cruda por persona (70 kg peso promedio) lo cual corresponde a 100 mg de extracto/kg de



peso corporal; 2- Debido a la diferencia al metabolismo acelerado de las ratas se recomienda incrementar cuatro veces más el consumo del extracto metanólico.

## **8.6 Colección y preservación de muestras.**

### **Plasma**

Los animales se anestesiaron por vía intramuscular con una dosis de Ketamina/Xilacina (100/50 mg/kg). El estado de anestesia se confirmó a través de la falta de reflejos por la estimulación del cojinete plantar y de la estimulación palpebral. Posteriormente, por punción en la vena porta se colectó sangre total en tubos con heparina, se centrifugó a 2000g por 10 minutos a temperatura ambiente y el plasma se conservó a -70 °C.

### **Tejido renal**

Después de la toma de muestra sanguínea, los animales se sacrificaron con 1.0 ml de lidocaína/epinefrina intracardiaca (20mg/0.005mg). La muerte del animal se confirmó a través de la falta de reflejos por la estimulación del cojinete plantar y de la estimulación palpebral, así como el paro de la frecuencia cardiaca.

Inmediatamente, la cavidad abdominal fue diseccionada y se colectaron los riñones, se perfusionaron con solución salina fría estéril y heparina. Los tejidos fueron diseccionados en dos partes iguales en sentido longitudinal y almacenados a -70°C y en formalina neutra.

## **8.7 Inmunotinción**

Los tejidos renales fijados en formalina neutra, fueron deshidratados en alcoholes graduales (PBS-alcoholes-Xilol) y embebidos en parafina. Luego, de los bloques de parafina se realizaron cortes seriados de 2-3 micras de espesor y montados en laminillas electrocargadas (Micro Slide, Cristal Cruz Santa Cruz, biotechnology, Inc.) y se hidrataron en alcoholes (Xilol-alcoholes-PBS). Las secciones fueron rehidratadas y los antígenos recuperados usando soluciones que desenmascaren los antígenos (solución amortiguadora de citratos pH 6.0 o EDTA a pH 9.0) en una olla de presión, luego, las laminillas se montaron en una cámara Shandon Sequenza (Thermo Fisher Scientific, Inc) y los tejidos fueron inmunomarcados de acuerdo al

procedimiento descrito por el sistema de inmunodetección basado en polímero Polymer (sistema de detección de DAB ratón / conejo PolyVue®, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, EE. UU.). Diluciones de anticuerpos (120 µl volumen final; anti-CML, -RAGE, -TGFβ1) se incubaron toda la noche a 4 ° C. Posteriormente, se adicionaron el potenciador Polyvue Plus y HRP y se incubaron con sustrato DAB plus/cromógeno. Los tejidos serán contrateñidos con hematoxilina de Harris. La captura de imágenes histológicas se realizó con el microscopio Axio Imager.A2 (ZEISS) con cámara integrada (Axiocam ICc5, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania). Para evaluar la intensidad de tinción y el porcentaje de células inmunoteñidas se usó el software Image-Pro-Plus versión 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA).

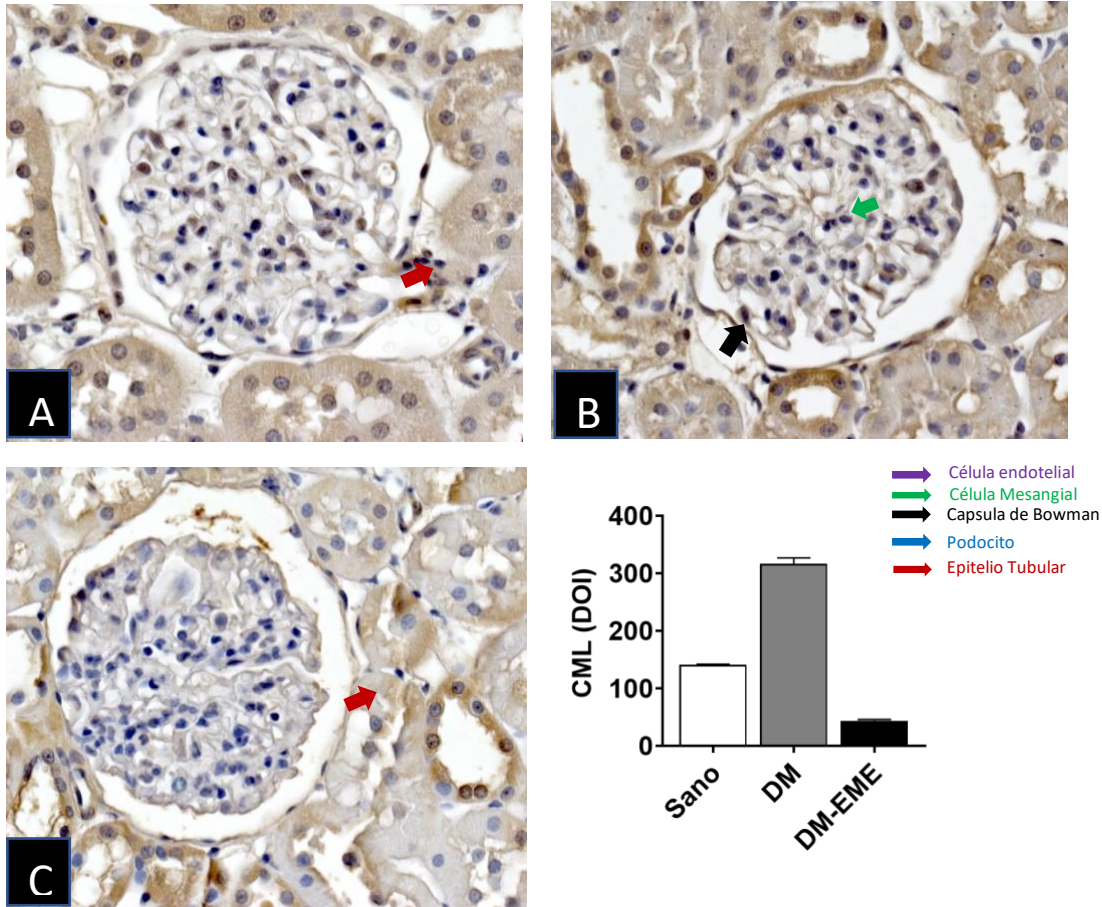
## **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los datos se expresaron en media ± desviación estándar (SD). El análisis se realizó con análisis de varianza de una vía. Las comparaciones post hoc de rango de Dunnett se usaron para determinar la fuente de las diferencias significativas, cuando correspondía. Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS para Windows (versión 21.0; IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.). Un valor de  $p < 0.05$  se considerará estadísticamente significativo.

## **10.RESULTADOS**

### **10.1 Depósitos de carboximetil-L-Lisina (CML) en el tejido renal**

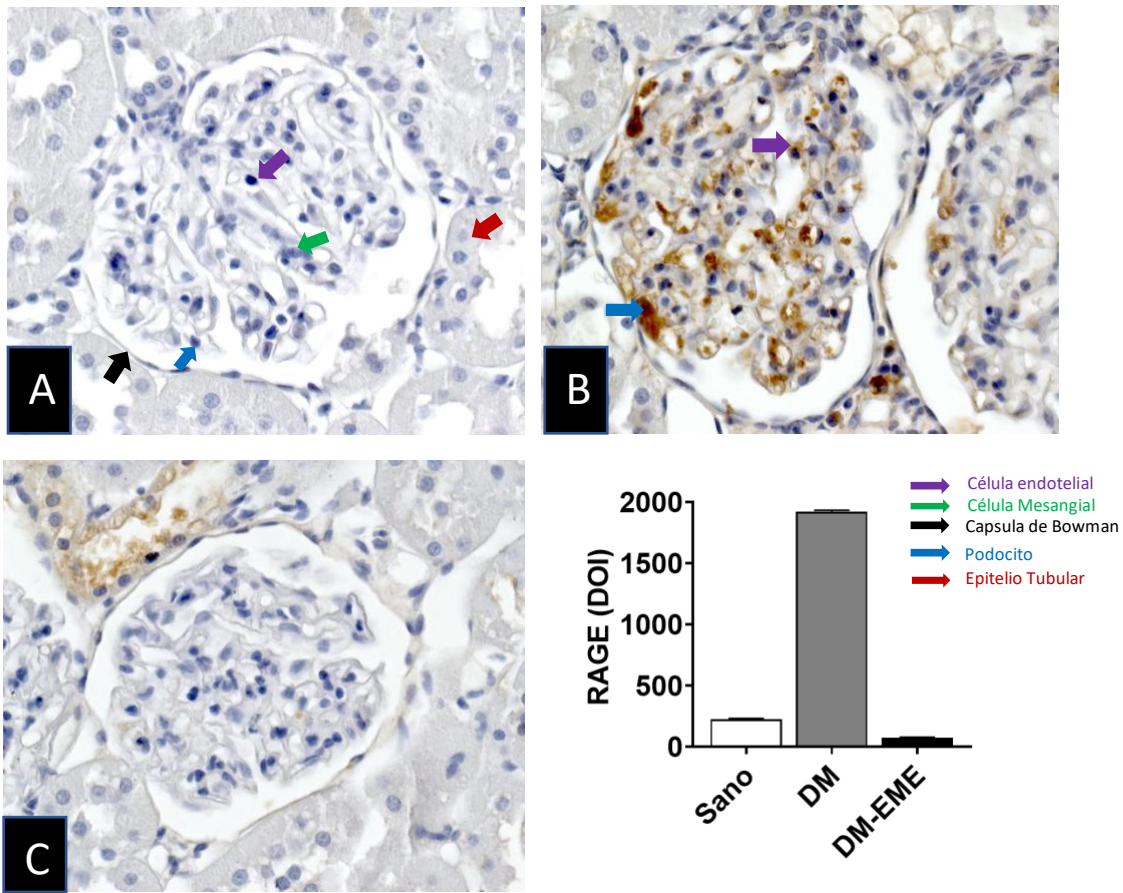
Para determinar el efecto del extracto metanólico (EME) en el depósito de CML en el tejido renal de ratas hiperglucémicas inducidas con STZ, se evaluó la distribución y la intensidad de tinción en los grupos estudiados. En las figuras 4-A-C muestra la distribución de la tinción de CML en el tejido renal. En todos los grupos, CML se distribuyó en el citoplasma de las células tubulares, mesangiales glomerulares y capsula de Bowman. No obstante, la intensidad de CML en estas unidades fue mayor en las ratas diabética comparada con las tratadas con EME ( $p < 0.05$ ) y sanas ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente, la tinción de CML en el glomérulo del grupo diabético tratado con EME fue menor que en el grupo sano ( $p < 0.05$ ) (Figura 4D).



**Figura 4.** Imágenes representativas del efecto del extracto metanólico de espinaca (EME) en la tinción Carboximetil-L- Lisina (CML) en tejido renal de ratas estudiadas. En A, **grupo sano**, B Diabeticas y en C *Diabeticas tratadas con EME*. En A , La flecha gris indica la tincion citoplasmatica de CML en el epitelio tubular; **en B**, La flecha verde indica tincion de CML en celulas mesangiales y La fecha negra indica la tincion citoplasmatica en la capsula de Bowman; **en C**, Magnitud 400X.

### 10.2 Efecto de EME sobre la expresión RAGE

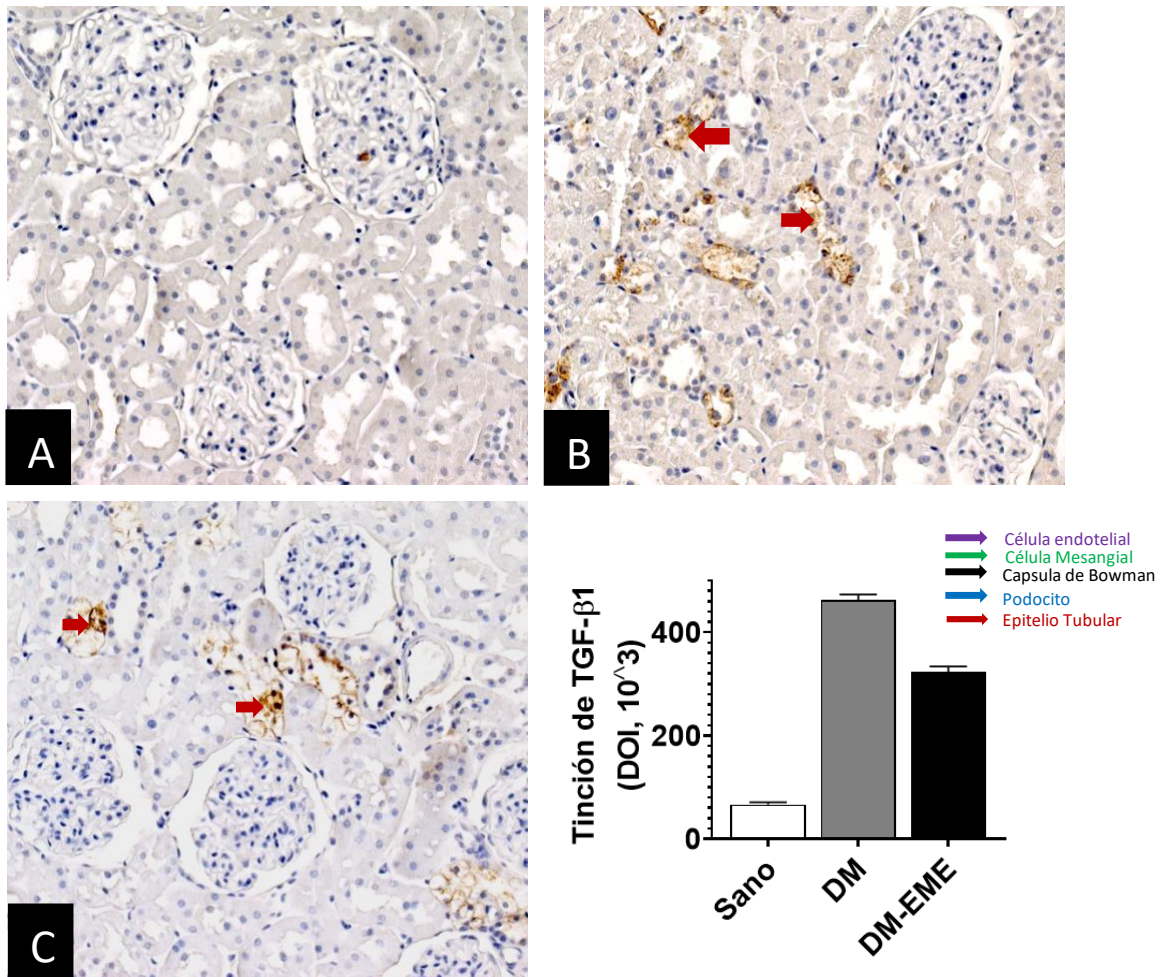
La figura 5 muestra la expresión de RAGE en el tejido renal determinada por su distribución e intensidad de inmunotincion. En ratas las diabéticas se observan que RAGE está distribuido principalmente en el glomérulo, sobre las células endoteliales y los podocitos. Comparado con las ratas diabéticas, la intensidad de RAGE en EME es considerablemente menor ( $p < 0.05$ ). La diferencia en la intensidad de RAGE en los glomérulos del grupo diabético con el sano es significativa. ( $p < 0.01$ ).



**Figura 5.** Imágenes representativas del efecto del extracto metanólico de espinaca (EME) en la tinción RAGE en tejido renal de ratas estudiadas. En **A**, **grupo sano**, **B** Diabeticas y en **C** *Diabeticas tratadas con EME*. En **A**, RAGE se encuentra negativo **en B**, La flecha morada y azul denotan que RAGE se encuentra positivo en el citoplasma de endotelio y podocitos. En **C**, RAGE se encuentra negativo Magnitud 400X.

### 10.3 Efecto de EME sobre la expresión de TGF- $\beta$ renal

La figura 6 muestra la expresión de la proteína TGF- $\beta$  en el tejido renal, determinada por su distribución e intensidad. En ratas diabéticas, TGF- $\beta$  se encuentra distribuida predominantemente en los túbulos, superpuesta en zonas de lesión tubular aguda. Con respecto al tejido renal de las ratas diabéticas, la intensidad de TGF- $\beta$  en EME es menor ( $p < 0.05$ ). La diferencia en la intensidad de TGF- $\beta$  en los túbulos del grupo sano es significativa menor comparado con EME ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Imágenes representativas del efecto del extracto metanólico de espinaca (EME) en la tinción de TGF-β en tejido renal de ratas estudiadas. En A, grupo sano, B Diabéticas y en C Diabéticas tratadas con EME. En A, TGF-β se encuentra negativo en B, Las flechas rojas indican la presencia de TGF-β citoplasmático y focal en zonas de lesión tubular aguda y en epitelio tubular residual. En C, La flecha roja indica TGF-β positivo citoplasmático y focal en una zona con lesión tubular aguda. Magnitud 200X.

## 11. DISCUSIÓN

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones más comunes de la DM. Esta caracterizada por proteinuria, hipertensión y reducciones progresivas de la función renal con alta morbilidad y mortalidad (1). Se estima que la mitad de todos los pacientes con DM tipo 2 (DMT2) y un tercio con DM tipo 1 desarrollarán

enfermedad renal crónica en el transcurso de su vida. (2). A diferencia de otras complicaciones relacionadas a la DM, la prevalencia de la ND no ha bajado en los últimos 30 años y es actualmente la principal causa de falla renal e inicio de terapia de sustitución renal en el mundo (3).

En los últimos años, ha surgido un interés específico en la nefropatía diabética. Como resultado, investigaciones recientes se han centrado en el desarrollo de terapias quimiopreventivas que puedan prevenir la fibrogénesis renal. Estas terapias tienen como objetivo mitigar el estrés oxidativo, un factor clave en la progresión de la enfermedad.

La espinaca es una hortaliza comestible de hoja verde de ver y sus variedades) debido a sus múltiples propiedades, es bajo en grasas, calorías y buen aportador de fibra y micronutrientes como vitamina C, vitamina A y minerales, especialmente hierro (35). Investigaciones anteriores han asociado los beneficios derivados de la ingesta de esta hortaliza a sus compuestos polifenólicos, los cuales incluyen  $\beta$ -carotenos, flavonoides, luteína, ácido linoleico y trilacoides. Estos, le otorgan propiedades hipoglicemiantes, hipolipemiantes, antioxidantes y antiinflamatorias (37)

La ND se desencadena por varias vías; una de las principales es la formación de AGE que inducen una alteración de la barrera de filtración glomerular al aumentar la permeabilidad de las células endoteliales, alterando la glicocálix endotelial y finalmente resultando en albuminuria. La vía RAGE (receptor para AGE) está críticamente involucrada en la transducción de la señalización celular subsiguiente relacionada con la inflamación y el estrés oxidativo. La activación de esta vía por los AGE lleva a la generación de especies reactivas de oxígeno además de disminuir los niveles de enzimas antioxidantes y los niveles celulares de glutatión, resulta en la sobre regulación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH), óxido nítrico sintasa (en inglés: NOS) y ciclooxigenasa (COX), con ello amplificando la inflamación y contribuyendo al establecimiento de un estado crónico

inflamatorio en los riñones, culminando en la pérdida gradual de la arquitectura renal y su función (4, 43).

La hipertrofia de la matriz, producto de la interacción AGE/RAGE se asocia con un aumento en la expresión de TGF- $\beta$ 1 y activación subsiguiente del sistema canónico Smad-2/3 (79-83). La activación de la vía canónica del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) provoca mayor acumulación de matriz extracelular y el engrosamiento de la membrana de la barrera glomerular (89-91).

Nuestros hallazgos demuestran que la suplementación con fitoquímicos contenidos en las hojas de espinaca en ratas diabéticas atenúa el daño renal inducido por un incremento del estrés oxidativo; demostrado por disminución de la producción de AGE y la interacción con su receptor en el grupo de intervención relacionado a la inhibición de su biosíntesis y por ende disminuir su acumulación en el tejido renal. Lo que, a su vez, disminuye la expresión de TGF- $\beta$  previniendo los cambios patológicos asociados.

## **12. CONCLUSIONES**

Los fitoquímicos contenidos en el EME poseen una acción benéfica en la atenuación del daño renal causado por el incremento del estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia; a una dosis de 400mg/kg/día administrado por doce semanas de forma intragástrica disminuye la formación de carboximetil-L-Lisina, y la expresión de RAGE y TFG- $\beta$ 1. La ingesta de polifenoles contenidos en el extracto metanólico de la Spinacia oleracea atenúa el daño renal asociado a la disminución del eje AGE/RAGE y expresión del factor profibritico TFG- $\beta$ 1 en los glomérulos y formación de N-Carboximetil-L-Lisina, en la expresión de TFG- $\beta$ 1 renal de ratas hiperglucémicas, asociado a la prevención y progresión de la nefropatía diabética.

## **13. FINANCIAMIENTO**

Parte de los recursos para la realización de esta investigación fueron otorgados por el presupuesto federal para el Hospital Juárez de México para el protocolo número **HJM 010 / 23-I.**

## 14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Umanath K, Lewis JB. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2018; 71: 884–895.
2. Saran R, Robinson B, Abbott KC, et al. US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 2017; 69: A7–A8.
3. Port FK, Held PJ. The US Renal Data System at 30 Years: A Historical Perspective. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 2019; 73: 459–461.
4. Bello-Chavolla OY, Rojas-Martinez R, Aguilar-Salinas CA, et al. Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutr Rev* 2017; 75: 4–12.
5. López-Leal J, Cueto-Manzano AM, Martínez-Torres J, et al. [Prevalence and risk factors of chronic kidney disease in the comprehensive care program DiabetIMSS]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2017; 55: S210-8.
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Nota Técnica: Estadística de defunciones registradas 2019, [https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/mortalidad/doc/defunciones\\_registradas\\_2019\\_nota\\_tecnica.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/mortalidad/doc/defunciones_registradas_2019_nota_tecnica.pdf) (2019).
7. Coca SG, Ismail-Beigi F, Haq N, et al. Role of intensive glucose control in development of renal end points in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis intensive glucose control in type 2 diabetes. *Arch Intern Med* 2012; 172: 761–769.
8. Hemmingsen B, Lund SS, Gluud C, et al. Intensive glycaemic control for patients with type 2 diabetes: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis of randomised clinical trials. *BMJ* 2011; 343: d6898.
9. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977–986.
10. Slinin Y, Ishani A, Rector T, et al. Management of hyperglycemia, dyslipidemia, and albuminuria in patients with diabetes and CKD: a systematic review for a KDOQI clinical practice guideline. *Am J kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2012; 60: 747–769.
11. Lu C, He JC, Cai W, et al. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11767–11772.
12. Kelly DJ, Gilbert RE, Cox AJ, et al. Aminoguanidine ameliorates overexpression of pro-sclerotic growth factors and collagen deposition in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2098–2107.
13. Lin Y-T, Tseng Y-Z, Chang K-C. Aminoguanidine prevents fructose-induced arterial stiffening in Wistar rats: aortic impedance analysis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 1038–1045.
14. Osicka TM, Yu Y, Lee V, et al. Aminoguanidine and ramipril prevent diabetes-



- induced increases in protein kinase C activity in glomeruli, retina and mesenteric artery. *Clin Sci (Lond)* 2001; 100: 249–257.
15. Youssef S, Nguyen DT, Soulis T, et al. Effect of diabetes and aminoguanidine therapy on renal advanced glycation end-product binding. *Kidney Int* 1999; 55: 907–916.
  16. Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2004; 24: 32–40.
  17. Bucala R, Makita Z, Vega G, et al. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9441–9445.
  18. Chiazza F, Cento AS, Collotta D, et al. Protective Effects of Pyridoxamine Supplementation in the Early Stages of Diet-Induced Kidney Dysfunction. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 2682861.
  19. Williams ME, Bolton WK, Khalifah RG, et al. Effects of pyridoxamine in combined phase 2 studies of patients with type 1 and type 2 diabetes and overt nephropathy. *Am J Nephrol* 2007; 27: 605–614.
  20. Miyata T, Ueda Y, Asahi K, et al. Mechanism of the inhibitory effect of OPB-9195 [(+/-)-2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-yl acetanilide] on advanced glycation end product and advanced lipoxidation end product formation. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1719–1725.
  21. Chun O, Kim D-O, Smith N, Schroeder D, Taek Han J, Lee C. (2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruits and vegetables in American diet. *Sci. Food Agr.* 85(10), 1715-24 p.
  22. Park J-H, Kim R-Y, Park E. Antidiabetic activity of fruits and vegetables commonly consumed in Korea: Inhibitory potential against  $\alpha$ -glucosidase and insulin-like action in vitro. *Food Sci Biotechnol* 2012; 21: 1187–1193.
  23. Rayner M, Emek SC, Gustafssona K, et al. A novel emulsifier from spinach with appetite regulation abilities. *Procedia Food Sci* 2011; 1: 1431–1438.
  24. Ko S-H, Park J-H, Kim S-Y, et al. Antioxidant Effects of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Supplementation in Hyperlipidemic Rats. *Prev Nutr food Sci* 2014; 19: 19–26.
  25. Montelius C, Osman N, Westrom B, Ahrne S, Molin G, Albertsson PA, et al. Feeding spinach thylakoids to rats modulates the gut microbiota, decreases food intake and affects the insulin response. *J Nutr Sci.* 2013;2:e20.
  26. Rebello C, Chu J, Beyl R, Edwall D, Erlanson-Albertsson C, L Greenway F. Acute Effects of a Spinach Extract Rich in Thylakoids on Satiety: A Randomized Controlled Crossover Trial 2015. 1-8 p.
  27. Bodiga, V. L., Eda, S. R., Veduruvalasa, V. D., Mididodla, L. D., Parise, P. K., Kodamanchili, S., Jallepalli, S., Inapurapu, S. P., Neerukonda, M., Vemuri, P. K., & Bodiga, S. (2013). Attenuation of non-enzymatic thermal glycation of bovine serum albumin (BSA) using  $\beta$ carotene. *International journal of biological macromolecules*, 56, 41–48.
  28. Sun Z, Liu J, Zeng X, Huangfu J, Jiang Y, Wang M, et al. Protective actions of microalgae against endogenous and exogenous advanced glycation endproducts (AGEs) in human retinal pigment epithelial cells. *Food Funct.* 2011;2(5):251-8.

29. Sanders RA, Rauscher FM, Watkins JB, 3rd. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2001;15(3):143-9.
30. Chous AP, Richer SP, Gerson JD, Kowluru RA. The Diabetes Visual Function Supplement Study (DiVFuSS). *The British journal of ophthalmology*. 2016;100(2):227-34.
31. Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM, Thandampallayam M, Putt D, Gierhart DL. Beneficial effects of the nutritional supplements on the development of diabetic retinopathy. *Nutrition & metabolism*. 2014;11(1):8.
32. Chuang CC, Martinez K, Xie G, Kennedy A, Bumrungpert A, Overman A, et al. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- $\alpha$ - mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(6):1511-21.
33. Wang Y, Kim HJ, Sparrow JR. Quercetin and cyanidin-3-glucoside protect against photooxidation and photodegradation of A2E in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2017;160:45-55.
34. Bhuiyan MN, Mitsushashi S, Sigetomi K, Ubukata M. Quercetin inhibits advanced glycation end product formation via chelating metal ions, trapping methylglyoxal, and trapping reactive oxygen species. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017;81(5):882-90.
35. Morelock TE, Correll JC. Spinach. En: Prohens J, Nuez F, editores. *Vegetables I* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2008 [citado 16 de agosto de 2022]. p. 189-218. (Handbook of Plant Breeding; vol. 1).
36. Roberts JL, Moreau R. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food Funct*. 2016;7(8):3337-53.
37. Fabián Pighín, A., & Lía Rossi de, A. (2010). Espinaca Fresca, Supercongelada Y En Conserva: Contenido De Vitamina C Pre Y Post Cocción Fresh, Frozen and Canned Spinach: Vitamin C Content Before and After Cooking. *Rev Chil Nutr*, 37(9), 201–207.
38. Marhuenda Berenguer, J. A., & García Vergara, J. (2016). Espinaca. *Serie Agricultura*, 289–301
39. Care, D., & Suppl, S. S. (2022). Classification and Diagnosis of Diabetes : Standards of Medical Care in Diabetes — 2022. *Diabetes Care*, 45(Suppl), 17–38.
40. DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(July), 1–23.
41. Stefan N, Cusi K. A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. abril de 2022;10(4):284-96.
42. Moreno-Altamirano L, García-García JJ, Soto-Estrada G, Capraro S, Limón-Cruz D. Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. *Revista Médica Del Hospital General De México*. julio de 2014;77(3):114-23.
43. Wada J, Makino H. Inflammation, and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clinical Science*. 1 de febrero de 2013;124(3):139-52

44. Bonnardel J, T'Jonck W, Gaublomme D, Browaeys R, Scott CL, Martens L, et al. Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity*. octubre de 2019;51(4):638-654.e9.
45. Targher G, Corey KE, Byrne CD, Roden M. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus — mechanisms and treatments. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. septiembre de 2021;18(9):599-612.
46. Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, et al. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 11704–11708.
47. Waris S, Winklhofer-Roob BM, Roob JM, et al. Increased DNA dicarbonyl glycation and oxidation markers in patients with type 2 diabetes and link to diabetic nephropathy. *J Diabetes Res* 2015; 2015: 915486.
48. Molitch ME, Steffes M, Sun W, et al. Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care* 2010; 33: 1536–1543.
49. Safi SZ, Qvist R, Kumar S, et al. Molecular mechanisms of diabetic retinopathy, general preventive strategies, and novel therapeutic targets. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 801269.
50. Bucala R, Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol* 1992; 23: 1–34.
51. Ikeda K, Higashi T, Sano H, et al. N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry* 1996; 35: 8075–8083.
52. Sharma C, Kaur A, Thind SS, et al. Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *J Food Sci Technol* 2015; 52: 7561–7576.
53. Awasthi S, Sankaranarayanan K, Saraswathi NT. Advanced glycation end products induce differential structural modifications and fibrillation of albumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2016; 163: 60–67.
54. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006; 114: 597–605.
55. Ott C, Jacobs K, Haucke E, et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2014; 2: 411–429.
56. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Imasawa T, et al. Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. *Kidney Int* 2001; 60: 2351–2359.
57. Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, et al. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest* 1998; 101: 1142–1147.
58. Miyata T, Ueda Y, Horie K, et al. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int* 1998; 53: 416–422.
59. Gugliucci A, Bendayan M. Renal fate of circulating advanced glycated end

- products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* 1996; 39: 149–160.
60. Vlassara H, Uribarri J, Cai W, et al. Advanced glycation end product homeostasis: exogenous oxidants and innate defenses. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1126: 46–52.
  61. Stirban A, Gawlowski T, Roden M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Mol Metab* 2014; 3: 94–108.
  62. Huang K-P, Chen C, Hao J, et al. AGEs-RAGE system down-regulates Sirt1 through the ubiquitin-proteasome pathway to promote FN and TGF- $\beta$ 1 expression in male rat glomerular mesangial cells. *Endocrinology* 2015; 156: 268–279.
  63. Beisswenger PJ, Howell SK, Russell GB, et al. Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. *Diabetes Care* 2013; 36: 3234–3239
  64. Yuan Y, Sun H, Sun Z. Advanced glycation end products (AGEs) increase renal lipid accumulation: a pathogenic factor of diabetic nephropathy (DN). *Lipids Health Dis* 2017; 16: 126.
  65. Sun H, Yuan Y, Sun Z. Update on Mechanisms of Renal Tubule Injury Caused by Advanced Glycation End Products. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 5475120.
  66. Goh S-Y, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1143–1152.
  67. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 1992; 267: 14987–14997.
  68. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)* 2005; 83: 876–886.
  69. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 1993; 143: 1699–1712.
  70. Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, et al. Amphotericin stimulates myogenesis and counteracts the antimyogenic factors basic fibroblast growth factor and S100B via RAGE binding. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 4880–4894.
  71. Soulis T, Thallas V, Youssef S, et al. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* 1997; 40: 619–628.
  72. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 1999; 274: 19919–19924.
  73. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1656–1666.

74. Tobon V, J.C.; Cuevas, E.; Torres-Ramos, M.A. Receptor for AGEs (RAGE) as Mediator of NF- $\kappa$ B Pathway Activation in Neuroinflammation and Oxidative Stress. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 2014, 13, 1615–1626.
75. Fukami K, Cooper ME, Forbes JM. Agents in development for the treatment of diabetic nephropathy. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14: 279–294.
76. Yamagishi S, Fukami K, Ueda S, et al. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 952–959.
77. Lu C, He JC, Cai W, et al. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11767–11772.
78. Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, et al. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- $\alpha$ -dependent pathway. *Diabetes* 2008; 57: 460–469
79. Serban AI, Stanca L, Geicu OI, et al. Extracellular matrix is modulated in advanced glycation end products milieu via a RAGE receptor dependent pathway boosted by transforming growth factor- $\beta$ 1 RAGE. *J Diabetes* 2015; 7: 114–124.
80. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, et al. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1814–1818.
81. Davis BJ, Forbes JM, Thomas MC, et al. Superior renoprotective effects of combination therapy with ACE and AGE inhibition in the diabetic spontaneously hypertensive rat. *Diabetologia* 2004; 47: 89–97.
82. Zimanyi MA, Denton KM, Forbes JM, et al. A developmental nephron deficit in rats is associated with increased susceptibility to a secondary renal injury due to advanced glycation end-products. *Diabetologia* 2006; 49: 801–810.
83. Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, et al. AGEs activate mesangial TGF- $\beta$ -Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int* 2004; 66: 2137–2147
84. Sutariya B, Jhonsa D, Saraf MN. TGF- $\beta$ : the connecting link between nephropathy and fibrosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2016; 38: 39–49.
85. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 2001; 108: 1853–1863.
86. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2282–2287.
87. Li J, Qu X, Bertram JF. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol* 2009; 175: 1380–1388.
88. Gilbert RE. The endothelium in diabetic nephropathy. *Curr Atheroscler Rep* 2014; 16: 410.

89. Tanimoto M, Gohda T, Kaneko S, et al. Effect of pyridoxamine (K-163), an inhibitor of advanced glycation end products, on type 2 diabetic nephropathy in KK-A(y)/Ta mice. *Metabolism* 2007; 56: 160–167.
  90. Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, et al. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2003; 17: 1762–1764.
  91. Tsuchida K, Makita Z, Yamagishi S, et al. Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia* 1999; 42:579–588.
  92. Burns WC, Twigg SM, Forbes JM, et al. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2484–2494.
  93. Twigg SM, Cao Z, McLennan S V, et al. Renal connective tissue growth factor induction in experimental diabetes is prevented by aminoguanidine. *Endocrinology* 2002; 143: 4907– 4915.
  94. Roestenberg P, van Nieuwenhoven FA, Wieten L, et al. Connective tissue growth factor is increased in plasma of type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care* 2004; 27: 1164–1170.
-



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



Dirección de Investigación y Enseñanza  
**Comité de Investigación**

Ciudad de México, 01 de junio de 2023  
CI/IO/050/2023  
Asunto: CARTA DE ACEPTACIÓN

**DR. JOSE JAVIER FLORES ESTRADA**  
Investigador Principal

Nos permitimos informarle que, de la evaluación realizada por el Comité de Investigación del Hospital Juárez de México, junto con el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Bioseguridad al protocolo registrado con los siguientes datos:

- Folio: **HJM 010/23-1**
- Título: **"Efecto del extracto metanólico de la Spinacia oleracea en la fibroaénesis renal de ratas con hiperlucemia, asociado a la interacción de los productos finales de la glicación avanzada con su receptor RAGE (AGEs-RAGE)"**
- Colaboradores: **Dr. Vicente Castreión Téllez, Lic. J Álvaro Vargas González, Dra. María Esther Rubio Ruíz, Dra. Katy Alejandra Sánchez Pozos y Méd. Luis José Pinto García.**
- Colaboración institucional: **Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".**

se concluyó, en sesión ordinaria:

- Dictamen Comité de Bioseguridad: **ACEPTADO.**
- Dictamen Comité de Ética en Investigación: **ACEPTADO.**
- Dictamen Comité de Investigación: **ACEPTADO.**


A partir de esta fecha queda autorizado y podrán dar inicio a su proyecto con una duración de 1 año, quedando como fecha límite el 1 de junio del 2024.

No omito mencionarle que cualquier enmienda o prórroga deberá estar plenamente justificada y solicitada oportunamente ante el Comité de Investigación.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente

  
**Dr. en C. Juan Manuel Bello López**  
Comité de Investigación

  
**Dra. en C. Gabriela Ibáñez Cervantes**  
Comité Ética en Investigación

  
**Dra. en C. Isela Montufar Robles**  
Comité de Bioseguridad

JMBL/GIC/IMR/ABB

Av. Instituto Politécnico Nacional No. 5160, Col. Magdalena de las Salinas C.P. 07760, Alcaldía Gustavo A. Madero, CDMX  
Tel: 57-47-75-60 Ext: 7375



2023  
**Francisco VILLA**  
EL REVOLUCIONARIO DEL NOROCCIDENTE



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL JUÁREZ  
DE MÉXICO

Dirección de Investigación y Enseñanza

Ciudad de México, 10 de mayo de 2023

Asunto: Incorporación de tesis a protocolo HJM 010/23-I.

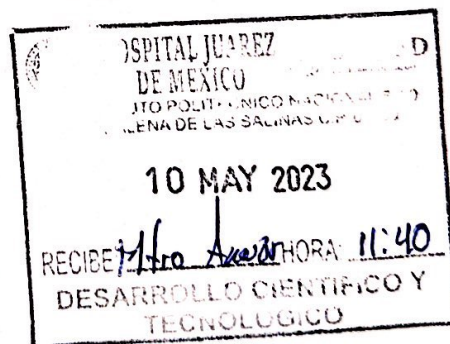
**Dr. En C. Juan Manuel Bello López**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**  
**HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO**  
**Presente**

Por este medio solicito amablemente su autorización para la incorporación del alumno **Luis José Pinto García**, médico residente de la especialidad en Medicina Interna, al protocolo de investigación "Efecto del extracto metanólico de la *Spinacia oleracea* en la fibrogénesis renal de ratas con hiperglucemia, asociado a la interacción de los productos finales de la glicación avanzada con su receptor RAGE (AGEs-RAGE)"; con número de registro **HJM 010/23-I**. Su participación incluirá obtener datos experimentales e interpretación con enfoque clínico para su tesis titulada "**Efecto del extracto metanólico de la *Spinacia oleracea* en la expresión de TFG- $\beta$  en el tejido renal de ratas con hiperglicemia, asociado a la formación de N-Carboximetil-L-Lisina**".

Agradeciendo la atención brindada a la presente, me despido de usted con un cordial saludo y quedo de usted.

**Atentamente**

**Dr. En C. José Javier Flores Estrada**  
**Investigador en Ciencias Medicas**







Solicitud de registro de Protocolo de Investigación

Ciudad de México, a 10 de mayo de 2023

Dra. Mónica Alethia Cureño Díaz  
Director(a) de Investigación y Enseñanza

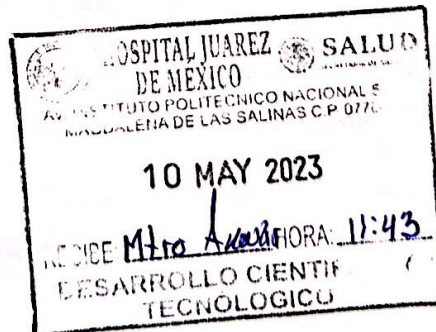
**Presente**

Con el fin de cumplir con la Ley General de Salud en México y el Reglamento para la Investigación del Hospital Juárez de México hago envío en formato electrónico y físico el protocolo con las siguientes características:

**\*Se adjunta una carta de aprobación expedida por otros comités debidamente registrados ante COFEPRIS y CONBIOETICA**

**DATOS DEL PROPONENTE**

| Solicitud                                                                                                                                                                                                                                                               |  |                                                   |   |                      |  |                                         |   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------|---|----------------------|--|-----------------------------------------|---|
| Evaluación                                                                                                                                                                                                                                                              |  | Enmienda                                          | X | Aprobación expedita* |  | Registro de Colaboración*/ metaanálisis |   |
| Nombre completo del proponente/investigador                                                                                                                                                                                                                             |  | José Javier Flores Estrada                        |   |                      |  |                                         |   |
| Correo electrónico                                                                                                                                                                                                                                                      |  | javier_70_1999@yahoo.com                          |   |                      |  |                                         |   |
| Teléfono oficina y ext.                                                                                                                                                                                                                                                 |  |                                                   |   |                      |  |                                         |   |
| Teléfono particular:                                                                                                                                                                                                                                                    |  | +5524502987                                       |   |                      |  |                                         |   |
| Adscripción                                                                                                                                                                                                                                                             |  | Unidad de investigación Hospital Juárez de México |   |                      |  |                                         |   |
| Nivel máximo de estudios:                                                                                                                                                                                                                                               |  | Doctorado                                         |   |                      |  |                                         |   |
| Disciplina                                                                                                                                                                                                                                                              |  | Biología celular                                  |   |                      |  |                                         |   |
| Especialidad                                                                                                                                                                                                                                                            |  | Enfermedades relacionadas a la diabetes           |   |                      |  |                                         |   |
| ¿Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores (SNI)?:                                                                                                                                                                                                                |  | SI                                                | X | NO                   |  | NIVEL                                   | 1 |
| Título del Protocolo/Tesis de Investigación "Efecto del extracto metanólico de la Spinacia oleracea en la fibrogénesis renal de ratas con hiperglucemia, asociado a la interacción de los productos finales de la glicación avanzada con su receptor RAGE (AGEs-RAGE)"; |  |                                                   |   |                      |  |                                         |   |
| Líneas de Investigación prioritarias en Salud del HJM, a la que corresponde la investigación propuesta.                                                                                                                                                                 |  |                                                   |   |                      |  |                                         |   |
| Diabetes, obesidad y síndrome metabólico                                                                                                                                                                                                                                |  |                                                   |   |                      |  |                                         |   |






**Lista de Cotejo de Validación de Tesis de Especialidades Médicas**

|              |     |       |      |
|--------------|-----|-------|------|
| <b>Fecha</b> | 11  | julio | 2023 |
|              | día | mes   | año  |

| INFORMACIÓN GENERAL<br>(Para ser llenada por el área de Posgrado)                                                                                                                                             |                                                                          |                                                    |                   |                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| <b>No. de Registro del área de protocolos</b>                                                                                                                                                                 | Si                                                                       | <input checked="" type="checkbox"/>                | No                | Número de Registro<br>HJM 010/23-I  |
| <b>Título del Proyecto</b><br>Efecto del extracto metanólico de la Spinacia oleracea en la expresión de TFG-β en el tejido renal de ratas hiperglucémicas, asociado a la formación de N-Carboximetil-L-Lisina |                                                                          |                                                    |                   |                                     |
| <b>Nombre Residente</b>                                                                                                                                                                                       | LUIS JOSÉ PINTO GARCIA                                                   |                                                    |                   |                                     |
| <b>Director de tesis</b>                                                                                                                                                                                      | DR. JOSÉ JAVIER FLORES ESTRADA,<br>DRA. LIZBETH TERESA BECERRILL MENDOZA |                                                    |                   |                                     |
| <b>Director de tesis metodológico</b>                                                                                                                                                                         | DR. JOSÉ JAVIER FLORES ESTRADA                                           |                                                    |                   |                                     |
| <b>Ciclo escolar que pertenece</b>                                                                                                                                                                            | 2020-2024                                                                | <b>Especialidad</b>                                | MEDICINA INTERNA  |                                     |
| INFORMACIÓN SOBRE PROTOCOLO/TESIS<br>(Para ser validado por la División de Investigación/SURPROTEM)                                                                                                           |                                                                          |                                                    |                   |                                     |
| <b>VERIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD</b>                                                                                                                                                                           | <b>HERRAMIENTA</b>                                                       | <b>PLAGIUS</b>                                     | <b>PORCENTAJE</b> | 24%                                 |
| <b>COINCIDE TÍTULO DE PROYECTO CON TESIS</b>                                                                                                                                                                  | SI                                                                       | <input checked="" type="checkbox"/>                | NO                |                                     |
| <b>COINCIDEN OBJETIVOS PLANTEADOS CON LOS REALIZADOS</b>                                                                                                                                                      | SI                                                                       | <input checked="" type="checkbox"/>                | NO                |                                     |
| <b>RESPONDE PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>                                                                                                                                                                     | SI                                                                       | <input checked="" type="checkbox"/>                | NO                |                                     |
| <b>RESULTADOS DE ACUERDO CON ANÁLISIS PLANTEADO</b>                                                                                                                                                           | SI                                                                       | <input checked="" type="checkbox"/>                | NO                |                                     |
| <b>CONCLUSIONES RESPONDEN PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>                                                                                                                                                       | SI                                                                       | <input checked="" type="checkbox"/>                | NO                |                                     |
| <b>PRETENDE PUBLICAR SUS RESULTADOS</b>                                                                                                                                                                       | SI                                                                       |                                                    | NO                | <input checked="" type="checkbox"/> |
| VALIDACIÓN<br>(Para ser llenada por el área de Posgrado)                                                                                                                                                      |                                                                          |                                                    |                   |                                     |
| <b>Si</b>                                                                                                                                                                                                     | <input checked="" type="checkbox"/>                                      | <b>Comentarios:</b>                                |                   |                                     |
| <b>No</b>                                                                                                                                                                                                     |                                                                          | Tesis validada para continuar proceso en enseñanza |                   |                                     |

VoBo.  
  
SURPROTEM/DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN